

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO**

**Tomislav Rimac**

**Optimiranje uvjeta indukcije biomase *Pseudomonas sp.* VLB120ΔC u procesu  
biotransformacije stirena u (S)-stiren oksid / Optimization of *Pseudomonas sp.*  
VLB120ΔC induction conditions for biotransformation of styrene to (S)-styrene oxide**

Završni rad

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Bruno Zelić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Bruno Zelić

dr. sc. Anita Šalić, poslijedoktorand

izv. prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan, 2016

*Zahvaljujem se svom mentoru profesoru dr. sc. Bruni Zeliću na stručnom vodstvu, korisnim savjetima i pomoći kod izrade ovog završnog rada.*

*Puno zahvaljujem asistentu Nikoli Panduriću, na velikoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela, obradi rezultata i pisanju ovog završnog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom svih ovih godina studija.*

## Sažetak

Stiren je monomer koji se koristi u proizvodnji CD kutija, kućanskih aparata, guma, dijelova za brod i mnogih drugih proizvoda, a zbog široke upotrebe u industriji može dospjeti u okoliš. Zbog štetnosti stirena i stiren-oksida velika se važnost pridaje mikroorganizmima koji su ih u mogućnosti ukloniti. Korištenje živih bića za uklanjanje otpada iz okoliša naziva se bioremedijacija. Jedan od organizama koji je u mogućnosti metabolizirati stiren je bakterija *Pseudomonas putida*. Radi se o bakteriji koju u prirodi nalazimo u tlu.

Osim za bioremedijaciju veliki interes za organizme poput *P. putide* postoji i zbog njihove moguće primjene u industriji. Biotransformacijom stirena u stiren oksid uz korištenje enzima stiren monooksigenaze porijeklom iz *Pseudomonas putida* dobiva se produkt velike enantiomerske čistoće.

Biotransformacija stirena u (*S*)-stiren oksid provedena je u kotlastom reaktoru pomoću genetski modificirane bakterije *Pseudomonas* sp. VLB120ΔC koja proizvodi enzim monooksigenazu. Indukcija enzima je provedena dodavanjem stirena nakon završetka rasta bakterije. Rast biomase proveden je u Erlenmayer tikvicama. U radu je ispitan utjecaj promjene uvjeta indukcije na količinu proizvedenog (*S*)-stiren oksida.

**Ključne riječi:** stiren, biotransformacija, indukcija, *Pseudomonas* sp. VLB120ΔC

## Summary

Styrene is a monomer commonly used in manufacturing CD casings, home appliances, rubber, ship parts and others, and due to its widespread industrial usage accidental emissions into the environment are quite likely. Due to the potential environmental damage of styrene and styrene-oxide contaminations microorganism that can reverse the damage are very important. Using living organisms to remove waste from the environment is called bioremediation. One of the organisms capable to metabolize styrene is the bacterial strain of *Pseudomonas putida*. In nature this bacteria can be found in the soil.

Aside from bioremediation purposes, there's a great interest towards *P. putida* and similar organisms because of their potential industrial applications. Using the styrene monooxygenase enzyme ( which is produced by *P. putida*) to produce styrene oxide yields a product with large enantiomeric excess.

Biotransformation of styrene into (*S*)-styrene oxide was conducted in a batch reactor using the genetically modified bacteria *Pseudomonas sp.* VLB120ΔC produces the styren monooxygenase enzyme. The enzyme was cultivated by adding styrene after the end of inoculation period. Biomass growth was conducted in Erlenmeyer flasks. This work examined the effects of different cultivation parameters in regards to the yield of (*S*)-styrene oxide.

**Keywords:** styrene, biotransformation, cultivation, *Pseudomonas sp.* VLB120ΔC

# Sadržaj

Summary .....	
Sažetak .....	
Sadržaj .....	
1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	4
2.1 Mikroorganizmi .....	4
2.2 Bakterije.....	4
2.3 <i>Pseudomonas putida</i> .....	5
Biološka oksidacija stirena .....	6
3. Eksperimentalni dio.....	7
3.1. Materijali .....	7
3.1.1 Mikroorganizmi .....	7
3.1.2 Kemikalije.....	8
3.1.3 Priprema otopina.....	8
3.2. Aparatura .....	9
3.2.1. Tresilica.....	9
3.2.2. UV/VIS Spektrofotometar .....	10
3.2.3. Laminarni kabinet .....	10
3.2.4. Centrifuga .....	11
3.2.5. Autoklav.....	12
3.2.6. Plinski kromatograf (GC) .....	12
3.3. Metode .....	13
3.3.1. Priprema inokuluma.....	13
3.3.2. Provedba biotransformacije .....	13

3.4. Uzorkovanje i analiza uzoraka .....	14
3.4.1. Određivanje koncentracije stirena i stiren oksida .....	14
3.4.2. Određivanje koncentracije biomase .....	15
4. Rezultati i rasprava.....	16
4.1. Utjecaj pH-vrijednosti na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze .....	16
4.2. Utjecaj vremena indukcije na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze.....	17
4.3 Utjecaj trajanja indukcije na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze .....	19
4.4 Utjecaj broja okretaja.....	20
4.5 Utjecaj temperature na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze .....	21
5. Zaključak.....	23
6. Literatura .....	24
7. Životopis.....	26

## 1. Uvod

Bakterije su jednostanični organizmi koji spadaju u prokariote, što znači da nemaju membranu oko jezgre. Mogu metabolizirati gotovo sve organske te čak i neke anorganske spojeve<sup>1</sup>. Većina bakterija je bezopasna za ljude, ali neke mogu uzrokovati bolesti i kvarenje hrane. Bakterije mogu biti korisni organizmi te su već prisutne u proizvodnji sireva.

Bakterije se mogu podijeliti po građi membrane, vrsti metabolizma i obliku. Prema membrani se dijele na gram pozitivne i gram negativne. Mogu biti u obliku štapića, kugle i spirale. Ovdje još možemo dodati i vibrione koji su nepotpune spirale<sup>2</sup>. Bakterije kojima je prisutstvo kisika uvjet za provođenje metaboličkih procesa nazivamo aerobnim bakterijama, dok se one bakterije koje ne trebaju kisik nazivaju anaerobnim bakterijama. Bakterije se razmnožavaju binarnom diobom pri čemu se stanica roditelj dijeli na dvije stanice kćeri. Neke bakterije posjeduju mehanizme genetske rekombinacije koja im omogućuje prijenos nukleinske kiseline, što inače diobom ne bi bilo moguće pošto stanice kćeri imaju isti genetski materijal. Ti dodatni mehanizmi su: transformacija, konjugacija i transdukcija.

Kod transformacije bakterije prihvaćaju molekule DNK s kojima dođu u kontakt. Nema puno vrsta bakterija koje mogu prirodno provesti transformaciju, ali mnoge bakterije, kao što je *E. coli*, mogu se umjetno osposobiti za prihvaćanje molekule DNK izlaganjem otopini  $\text{CaCl}_2$ . Transformacija je vrlo koristan mehanizam u području rekombinacije DNK.

Konjugacija je prijenos DNK prilikom kontakta s drugom stanicom i provodi se posredovanjem plazmida, dodatnog genetskog materijala koji se ne nalazi na kromosomu.

Transdukcija je prijenos DNK koji se provodi pomoću bakteriofaga.<sup>3,4</sup>

*Pseudomonas putida* je gram-negativna bakterija koju najčešće nalazimo u tlu, a pokreće se pomoću jednog ili više bičeva. Interesantna je ekolozima zbog mogućnosti metaboliziranja aromatskih i olifatskih ugljikovodika<sup>3</sup>. Istraživanja su pokazala da može metabolizirati naftalen u tlu<sup>5</sup> i konvertirati ulje stirena<sup>6</sup> u PHA (polihidroksialkanoati) koji se razgrađuju u prirodi. Osim upotrebe u bioremedijaciji, moguća je upotreba i u biotehnologiji. Još 1926. godine zabilježeno je da neki sojevi *Pseudomonas* mogu rasti na 80 različitih organskih spojeva<sup>7</sup>.

Biotehnologija je upotreba živih organizama za proizvodnju kemijskih spojeva. Soj *Pseudomonas* se već koristi za sintezu akrilata iz akrilonitrila<sup>8</sup>.

Za razgradnju supstrata iz okoliša bakterije proizvode enzime koji su složene bjelančevine koje djeluju kao katalizatori kemijske reakcije. *Pseudomonas* je prva vrsta kod koje je otkrivena skupina enzima oksigenaze koji oksidiraju aromatske ugljikovodike<sup>9</sup>. Monooksigenaze su skupina enzima koji kataliziraju ubacivanje jednog atoma kisika u organski supstrat.

Stiren je štetan svim živim bićima zbog utjecaja koji ima na staničnu membranu<sup>10</sup>, dok stiren oksid nastaje kao produkt degradacije stirena u ljudskoj jetri i izrazito je toksičan<sup>11</sup>

Stiren prirodno možemo naći u nafti, a zbog široke primjene u proizvodnji plastike i guma neizbježno nastaje onečišćenje stirenom u prirodi. U kemijskoj industriji stiren se dobiva katalitičkom dehidrogenacijom etilbenzena u parnoj fazi<sup>12</sup>.

Stiren-7,8-oksidi, koriste se kao intermedijeri za dobivanje 2-feniletanola koji se koristi kao baza za parfeme, i tetramisola koji se koristi protiv parazita. Kemijski se dobiva reakcijom stirena s vodom i klorom kako bi se dobio stiren klorohidrin koji ciklizira u stiren oksid<sup>12</sup>. Biokatalitičkim procesom (*S*)-stiren oksid može se proizvesti iz lako dostupnog stirena sa enantiomerskom čistoćom od 99%.<sup>13</sup> Biooksidacije kakvima se dobiva stiren oksid su ovisne o kofaktorima i katalizirane višekomponentnim enzimima.<sup>14</sup> Tako je na primjeru oksidacije stirena u stiren oksid stiren monooksigenaza ovisna o flavinu i sastavljena od flavin reduktaze (StyB) i monooksigenaze (StyA).<sup>15</sup>

Biotransformacija stirena pomoću bakterija poput *Pseudomonas* interesantna je kako zbog mogućnosti razgradnje štetnog stirena tako i zbog potencijala u sintetskoj organskoj kemiji.

Rastući trend u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji je upotreba biokatalizatora. Industrijska biotehnologija smatra se ključnom tehnologijom za budući ekonomski razvoj. Prednost biokatalitičkih procesa je u velikoj mjeri to što su blaži prema okolišu jer se provode u blažim reakcijskim uvjetima, koriste manje energije za reakciju i ostvaruju manju emisiju stakleničkih plinova. Nedostaci bioindustrije leže u visokim troškovima ulaganja i nestabilnosti enzima, dodatni trošak može izazvati i zbrinjavanje biomase.<sup>16,12</sup>



Cilj ovog rada je odrediti optimalne uvjete za indukciju bakterije *Pseudomonas putida* u procesu biotransformacije stirena u (*S*)-stiren oksid pomoću enzima monooksigenaze. Enzim monooksigenazu proizvode stanice *Pseudomonas sp.* VLB120ΔC. Proces biotransformacije se odvija u erlenmayer tikvicama na tresilici. Optimalni uvjeti određeni su za svaki parametar zasebno mjerenjem specifične aktivnosti enzima monooksigenaze pri različitim uvjetima provedbe procesa.

## 2. Opći dio

### 2.1 Mikroorganizmi

Mikroorganizmi su jednostanični organizmi u koje spadaju bakterije, gljive, protisti i praživotinje. Mikroorganizmi su sveprisutni i nalaze se svuda oko nas: u zraku, vodi, zemlji, ali i u našoj hrani i na površini našeg tijela.

Sustav klasifikacije mikroorganizama koji se koristi je sustav tri domene, kako ga je predložio Carl Woese 1990. godine. Tako se prema tom sustavu mikroorganizmi dijele na tri domene: Archea, Bacteria i Eucarya, koji se dalje dijele na carstva.

### 2.2 Bakterije

Bakterije su jedan od prvih oblika života koji su se pojavili na Zemlji. Uglavnom su bakterije heterotrofni organizmi, ponekad u simbiotskom, a ponekad u parazitskom odnosu. Tek manji dio bakterija su autotrofni organizmi kao što su cijanobakterije. Neke bakterije trebaju kisik (aerobne) dok je za neke on toksičan (anaerobne). Bakterije možemo naći u jednom od tri tipična oblika: štapića, kugle i kao spirala. Toj podjeli se još mogu dodati vibrioni koji su nepotpune spirale.

Bakterije se razmnožavaju binarnom diobom. To je aseksualna reprodukcija u kojoj se matična stanica dijeli na dvije genetski iste stanice kćeri. Zahvaljujući takvom mehanizmu reprodukcije bakterije se mogu brzo razmnožavati, a uz dobre uvjete neke bakterije mogu udvostručiti svoju populaciju za manje od 10 minuta. Bakterije imaju cikličnu molekulu DNK u jezgri, a neke imaju i plazmide. Plazmidi su dodatni DNK materijal koji reguliraju otpornost na antibiotike ili faktore za virulentnost. Plazmidi se razmnožavaju neovisno od jezgre, a mogu se i razmjenjivati između jedinki. Rast bakterija na hranjivoj podlozi odvija se u četiri faze: lag faza u kojoj se sintetiziraju enzimi potrebni za prehranu organizma, log faza u kojoj počinje eksponencijalni rast, stacionarna faza u kojoj prestaje nagli rast te nakraju faza odumiranja u kojoj opada populacija bakterija uslijed nedostatka hrane.

### 2.3 *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* je rod bakterija koju nalazimo u tlu, a zbog svojih obilježja zanimljiva je u primjeni u ekologiji i poljoprivredi. Osnova zanimanja za ovu bakteriju je sposobnost nekih sojeva *P. putida* za razgradnju organskih toksičnih spojeva. Prema istraživanjima *P. putida* može razgraditi aromatske i alifatske ugljikovodike<sup>1</sup>.

### 2.4 *Pseudomonas sp. VLB120ΔC*

Genetski modificirani soj bakterije *Pseudomonas putida* VLB120ΔC koja raste u prisutnosti stirena u usporedbi s *E. coli* ima veću toleranciju na organska otapala i veću volumetrijsku produktivnost u procesu proizvodnje stiren oksida.<sup>17</sup> Uz to ima i veću otpornost na toksične tvari iako genetski modificirane bakterije *E. coli* imaju veću specifičnu aktivnost biotransformacije stirena u (S)-stiren oksid, što znači da u određenom vremenu proizvode veću količinu produkta po jedinici vremena i masi biomase.<sup>7</sup>

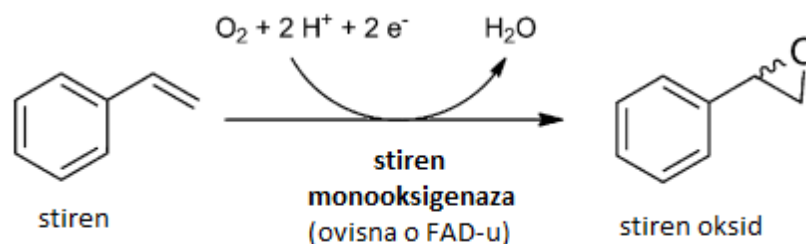
### 2.5 Stiren i (S)-stiren oksid

Pri sobnoj temperaturi stiren je bezbojna, viskozna kapljevina neugodnog mirisa kad je u većim količinama. Molekulska formula stirena je  $C_8H_8$ . Na industrijskoj skali proizvodi se dehidrogenacijom etilbenzena. Stiren se lako polimerizira, a najviše se koristi za dobivanje plastike, lateks boja i premaza, guma i poliestera.

Stiren oksid, molekulske formule  $C_8H_8O$  dobiva se oksidacijom stirena. Koristi se kao intermedijer u nekoliko procesa kao što je na primjer dobivanje baza za parfeme, tetramisola (lijek protiv parazita) te za obradu tekstila.<sup>12</sup>

## 2.6 Oksidacija stirena

Oksidacija stirena u stiren oksid može se obavljati kemijskim ili biološkim putem. Velika prednost biološkog puta oksidacije je to što je enantioselektivna za razliku od kemijskog puta.



Slika 1. Biotransformacija stirena u (*S*)-stiren oksid

Dva su načina proizvodnje stiren oksida kemijskom sintezom. Prvi uključuje reakciju stirena, klora i vode čime se dobiva klorhidrin, koji reakcijom ciklizacije s vodenom bazom daje stiren oksid. Drugi način proizvodnje je reakcijom epoksioksidacije stirena s peroksiacetatnom kiselinom.

## Biološka oksidacija stirena

Razni mikroorganizmi koriste stiren kao jedini izvor ugljika i energije. Selektivna biotransformacija je jedna od najkorisnijih za sintetske primjere zbog svoje enantioselektivnosti. Biooksidacije su katalizirane enzimima i ovisne o kofaktorima. U praksi to znači da je učestalija upotreba cijelih stanica, a ne izoliranih enzima.

Jedan od načina dobivanja (*S*)-stiren oksida je biotransformacijom koristeći enzim stiren monooksigenazu. Pronađeno je da bakterija *Pseudomonas putida* koristi enzim monooksigenazu za katabolizam stirena. Genetski promijenjena bakterija *Pseudomonas* sp. VLB120ΔC ima puno veću katalitičku aktivnost oksidacije stirena.

### 3. Eksperimentalni dio

U ovom radu proveden je uzgoj bakterije soja *P. putida* VLB120 $\Delta$ C. Za uzgoj *P. putida* VLB120 $\Delta$ C korišten je medij M12, a pokusi su provedeni u tikvicama na tresilici. Iz tikvica su uzeti uzorci u određenim vremenskim intervalima te su određivane koncentracije biomase.

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

Za pokus je korišten soj bakterije *P. putida* VLB120 $\Delta$ C dobiven iz Laboratory of Chemical Biotechnology, Department of Biochemical and Chemical Engineering, TU Dortmund, University Dortmund, Njemačka. Kulture su precjepljivane svakih mjesec dana na Petrijeve zdjelice s LB hranjivim medijem, čuvane na 30 °C i korištene po potrebi.

### 3.1.2 Kemikalije

Kemikalije korištene u pokusima prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AcrosOrganics)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (CarloErbaReagents)
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel De Maën)	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Kemika)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AcrosOrganics)	NaCl (Isocommerz)
glukoza (Sigma – Aldrich)	$\text{NH}_4\text{Cl}$ (Kemika)
glukoza PAP test (Herbos Dijagnostika d.o.o.)	tripton (Liofilchem)
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (Kemika)	$\text{ZnSO}_4$ (Denver EquipmentCompany)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Sigma – Aldrich)	BEHP (Sigma – Aldrich)
kvašćev ekstrakt (Liofilchem)	stiren (Sigma – Aldrich)
$\text{MgSO}_4$ (AcrosOrganics)	stiren – oksid (AcrosOrganics)
$\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Kemika)	cikloheksan (Lachner)
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (AcrosOrganics)	

### 3.1.3 Priprema otopina

Otopina glukoze za pripremu predkultura pripremljena je otapanjem 50 g glukoze u  $0,1 \text{ dm}^3$  destilirane vode. Otopine glukoze za provođenje eksperimenata u tikvicama pripremljene su otapanjem 150 g glukoze u  $1 \text{ dm}^3$  destilirane vode od čega je u tikvice dodavano po  $10 \text{ cm}^3$  otopine sterilno, dok je otopina glukoze za pokus u bioreктору pripremljena otapanjem 10 g glukoze u  $0,1 \text{ dm}^3$  destilirane vode.

Sintetska podloga za uzgoj *P. putida*, sintetski medij M9, pripremljen je otapanjem 17,097 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 3,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{NaCl}$ , 1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  i 0,12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  u 1  $\text{dm}^3$  destilirane vode u koju je dodano 1  $\text{cm}^3$   $\text{US}^{\text{Fe}}$  otopine elemenata u tragovima.

Sintetska podloga za uzgoj *P. putida*, sintetski medij M12, pripremljen je otapanjem 2,20 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,40 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,04 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g  $\text{NaCl}$ , i 2,00 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 1  $\text{dm}^3$  destilirane vode. U otopinu su dodani i elementi u tragovima dodavanjem 1  $\text{cm}^3$  prije pripremljenih otopina soli do konačnih koncentracija:  $2 \cdot 10^{-3}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-3}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{Na}_3\text{-citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $2 \cdot 10^{-5}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \cdot 10^{-5}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $3 \cdot 10^{-4}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  i  $1 \cdot 10^{-2}$  g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{US}^{\text{Fe}}$  otopina elemenata u tragovima pripremljena je otapanjem 4,87 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,56 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,05 g  $\text{ZnSO}_4$ , 0,84 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,25 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  te 0,15 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  u 1  $\text{dm}^3$  destilirane vode.

Kalij fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen je otapanjem 87 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  u 0,5  $\text{dm}^3$  destilirane vode, te 68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 0,5  $\text{dm}^3$  destilirane vode kako bi se dobile otopine soli koncentracije 1  $\text{mol/dm}^3$ . Zatim je pomiješano 80  $\text{cm}^3$  otopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 20  $\text{cm}^3$  otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  te nadopunjeno do 1000  $\text{cm}^3$  kako bi se dobio fosfatni pufer koncentracije 0,1  $\text{mol/dm}^3$ .

Kompleksna podloga za uzgoj *P. putida* pripremljena je otapanjem 5 g  $\text{dm}^{-3}$  kvašćevog ekstrakta, 10 g  $\text{dm}^{-3}$  triptonu i 10 g  $\text{dm}^{-3}$   $\text{NaCl}$  u 1  $\text{dm}^3$  destilirane vode.

Sastav podloge za uzgoj bakterije u petrijevim zdjelicama jednak je sastavu kompleksne podloge, osim što je dodano i 15 g  $\text{dm}^{-3}$  agara koji očvrstne podlogu.

## 3.2. Aparatura

### 3.2.1. Tresilica

Proces uzgoja bakterije *P. putida* u tikvicama proveden je na tresilici (Innova 4330 New Brunswick Scientific) (slika 2) u tikvicama volumena 1  $\text{dm}^3$ . Pokusi biotransformacije *in vitro* su provedeni u ependorficama volumena 15  $\text{cm}^3$ .



Slika 2. Laboratorijska tresilica

### 3.2.2. UV/VIS Spektrofotometar

Absorbancija biomase određivana je pomoću dvozračnog UV/VIS spektrofotometra prikazanog na slici 3 (UV - 1800, SHIMADZU).



Slika 3. UV/VIS spektrofotometar

### 3.2.3. Laminarni kabinet

Precjepljivanje bakterija na hranjivu podlogu i uzimanje uzoraka u sterilnim uvjetima provođeno je u prijenosnom laminarnom kabinetu KTP - A prikazanom na slici 4 proizvođača Klimaoprema.





Slika 4. Laminarni kabinet

### 3.2.4. Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provođeno je u stojećoj, horizontalnoj centrifugi Centric 150 proizvođača Tehnica prikazanoj na slici 5 pri  $n = 14.000 \text{ min}^{-1}$  u trajanju od 10 min.



Slika 5. Centrifuga

### 3.2.5. Autoklav

Za sterilizaciju tikvica, potrebnog laboratorijskog posuđa i hranjivih podloga korišten je autoklav (Sutjeska) prikazan na slici 6.



Slika 6. Autoklav

### 3.2.6. Plinski kromatograf (GC)

Za kemijsku analizu uzoraka korišten je plinski kromatograf Shimadzu Gas Chromatography GC – 2014, opremljen auto injektorom AOC – 20i i generatorom vodika Parker Chrom gas, prikazan na slici 7.



Slika 7. Plinski kromatograf

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Priprema inokuluma

Kako bi provedba pokusa bila moguća potrebno je prvo pripremiti inokulum. Biomasa je s Petrijeve zdjelice precijepljena u Erlenmeyerovu tikvicu s LB medijem te uzgajana na tresilici 8 sati pri temperaturi 30 °C i 250 o/min. Nakon toga je 10 cm<sup>3</sup> biomase iz LB medija preneseno u Erlenmeyerovu tikvicu s M12 medijem, uzgoj je proveden 8 sati na tresilici pri temperaturi 30 °C i 250 o/min. Nakon prekida uzgoja na tresilici, Erlenmeyerove tikvice s inokulumom bile su prenesene u laminarni kabinet.

#### 3.3.2. Provedba biotransformacije

##### *Priprema stanica*

U laminarnom kabinetu pri sterilnim uvjetima uzeti su uzorci biomase, kojoj je koncentracija određena mjerenjem absorbancije. Vrijednosti volumena koje potrebno uzeti kako bi se postigla željena koncentracije biomase u konačnici računati su preko izraza:  $\gamma_1 * V_1 = \gamma_2 * V_2$ . Nakon izračunatih potrebnih vrijednosti volumena biomase, ista je iz Erlenmeyerovih tikvica prenijeta u ependorfice zapremnine 15 cm<sup>3</sup>. Ependorfice su potom centrifugirane pri  $n = 5.000 \text{ min}^{-1}$  u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja dekantiran je vodeni sloj a zaostali talog (biomasa) dobro je resuspendiran u fosfatnom puferu (pH = 7,4) te ponovno centrifugiran pri istim uvjetima.

##### *Biotransformacija*

Pročišćena biomasa je resuspendirana u 4,75 cm<sup>3</sup> fosfatnog pufera (pH = 7,4) te joj je koncentracija određena mjerenjem absorbancije. Ependorfice zapremnine 15 cm<sup>3</sup> s resuspendiranom pročišćenom biomasom su pričvršćene na tresilicu, a pokus je proveden pri 250 min<sup>-1</sup> i temperaturi od 30 °C. Nakon 10 minuta u svaku ependoricu je dodato 250 mm<sup>3</sup> (μL) otopine stirena u etanolu koncentracije 30 mmoldm<sup>-3</sup> čime je započeo proces biotransformacije.

### 3.4. Uzorkovanje i analiza uzoraka

Uzorci su uzimani sterilno iglom kroz septum na donjem otvoru Erlenmeyer tikvice. Mjerena je apsorbancija iz čega je određena početna koncentracija biomase u tikvici. Jednom kad je određena koncentracija biomase u tikvici iz tih podataka je određen potrební volumen obzirom na koju je računata željena koncentracija biomase koja je provjeravana neposredno nakon resuspenzije pročišćene biomase. Koncentracije biomase u uzorku određivane su na način opisan u poglavlju 3.4.2.

Nakon određenog, prethodno definiranog vremena provedba biotransformacije je zaustavljena dodatkom 5 cm<sup>3</sup> cikloheksana, a njen sadržaj je dobro izmiješan na vorteksu te je zatim centrifugiran pri  $n = 5.000 \text{ min}^{-1}$  u trajanju od 10 min kako bi se odvojile organske i vodene faze.

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije stirena i stiren oksida

Nakon što su centrifugiranjem odvojene organska i vodena faza iz organske je faze automatskom pipetom otpipetiran određeni volumen organske faze. Prije analize na plinskom kromatografu uzorci su profiltrirani kroz filter CHROMAFIL<sup>®</sup> Xtra PA-20/25, 0,20 µm. Uzorci su analizirani tzv. „*splitless*“ metodom pri temperaturi injektora 280 °C koristeći ZB - WAX kolonu duljine 30 m — unutarnjeg promjera 0,53 mm na plameno-ionizacijskom detektoru pri temperaturi od 240 °C.

Iz koncentracije stiren oksida može se izračunati specifična aktivnost enzima monooksigenaze (jednadžba 1).

$$U_a = \frac{n(SO)}{t * m_{cdw}} [U] \quad (1)$$

$U_a$  predstavlja specifičnu aktivnost enzima stiren monooksigenaze u stanicama *P. putida* i odgovara količini nastalog stiren oksida u µmol koja nastaje u jednoj minuti po gramu suhe tvari.

### 3.4.2. Određivanje koncentracije biomase

Uzorcima biomase mjerena je apsorbancija spektrofotometrom pri  $\lambda = 600$  nm. Ako je vrijednost apsorbancije bila veća od 0,5 uzorci su razrjeđivani. Optička gustoća (OD) računata je iz razlike apsorbancija uzoraka poznate koncentracije (ABS) i čiste podloge (ABS<sub>0</sub>) uzimajući u obzir faktor razrjeđenja  $f$  (jednadžbe 2 i 3):

$$OD = (ABS - ABS_0) \cdot f \quad (2)$$

$$\gamma = OD * 0,55 \quad (3)$$

Uzorak iste apsorbancije centrifugiran je u kiveti koja je prethodno sušena na 120 °C do konstantne mase. Nakon centrifugiranja odekantiran je kapljevinski ostatak, a kiveta s biomasom sušena je pri 120 °C do konstantne mase. Na ovaj način određene su mase suhe biomase te je izrađen baždarni dijagram za određivanje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji suhe biomase (eng. *cell dry weight*).

## 4. Rezultati i rasprava

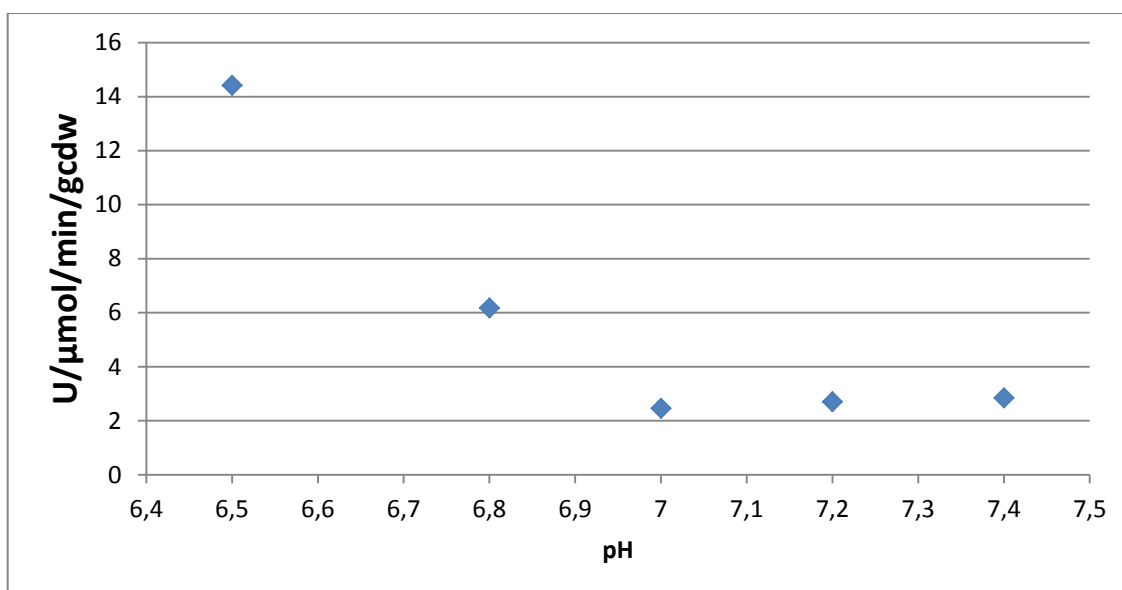
U ovom radu provedeni su pokusi uzgoja *P. putida* u svrhu određivanja najboljih uvjeta za provedbu procesa indukcije. Za svaki ispitivani procesni parametar rađena su tri paralelna pokusa.

### 4.1. Utjecaj pH-vrijednosti na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Na slici 8 i u tablici 2 prikazani su rezultati pokusa određivanja utjecaja pH-vrijednosti na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze.

Tablica 2. Utjecaj pH-vrijednosti na prividnu aktivnost enzima monooksigenaze

pH	Prosječna specifična aktivnost, $\bar{U}_a$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ )	Standardna devijacija
pH 6,5	14,42102	1,718547
pH 6,8	6,176173	1,365358
pH 7,0	2,460134	1,739577
pH 7,2	2,705664	0,958872
pH 7,4	2,847592	1,346226



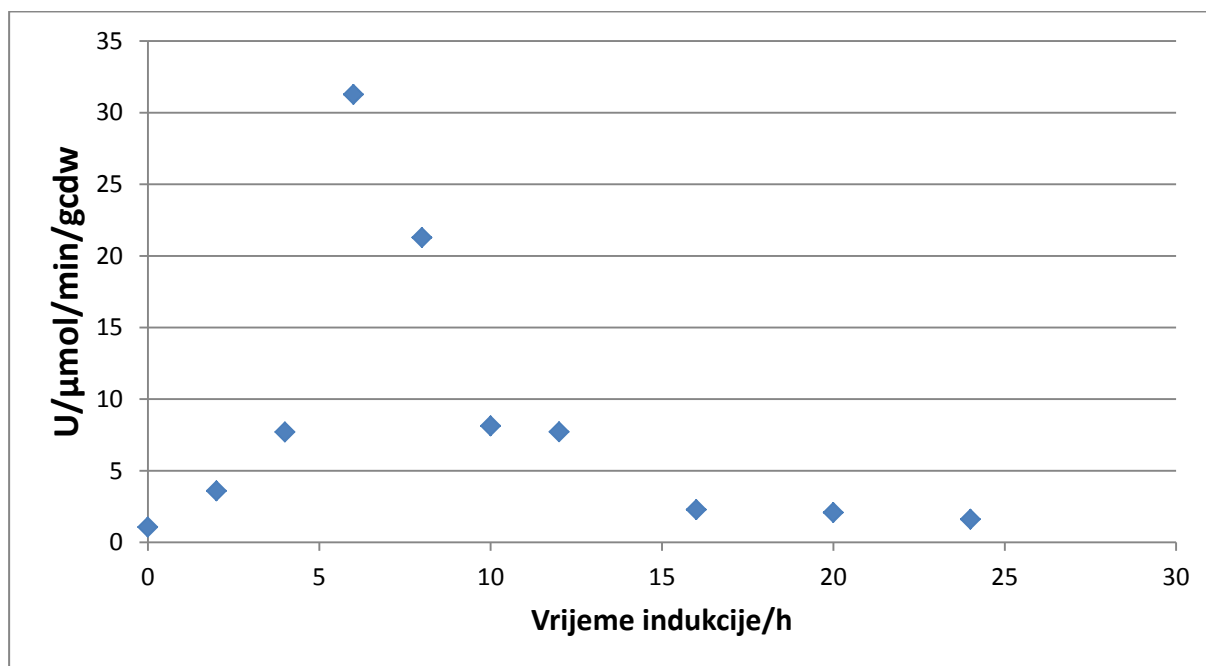
Slika 8. Utjecaj pH-vrijednosti na prividnu aktivnost enzima monooksigenaze

Iz rezultata pokusa vodljivo je da je najveća prividna aktivnost dobivena pri pH 6,5 i iznosi 14,42  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ . Pri pH 6,8 dobivena je aktivnost 6,17  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ . Najmanje aktivnosti postignute su za pH vrijednosti veće od 7,0 i iznosile su: pH 7,0 - 2,46  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ ; pH 7,2 - 2,70  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ ; te pri pH 7,4 - 2,84  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ .

#### 4.2. Utjecaj vremena indukcije na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Tablica 3. Utjecaj vremena indukcije na prividnu aktivnost enzima monooksigenaze.

Vrijeme/h	Prosječna specifična aktivnost, $\bar{U}_a$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ )	Standardna devijacija
0	1,069372	0,037799
2	3,598044	2,650021
4	7,707507	5,072661
6	31,27462	5,551444
8	21,28586	13,51866
10	8,137945	0,960038
12	7,721431	3,311023
16	2,286287	1,419414
20	2,094475	0,993964
24	1,623209	0,040332



Slika 9. Utjecaj vremena indukcije na prividnu aktivnost

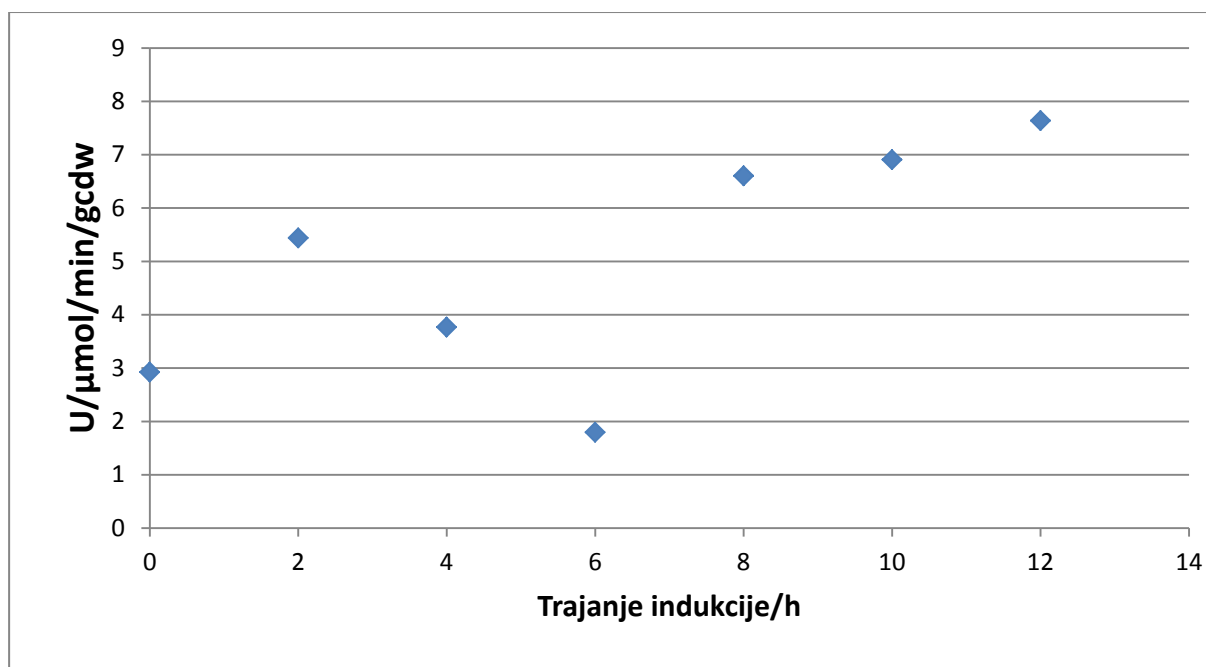
Na slici 9 i u tablici 3 prikazani su rezultati pokusa određivanja utjecaja vremena indukcije na prividnu aktivnost enzima monooksigenaza. Vidljivo je da je najveća aktivnost postignuta kada je indukcija provedena šest sati nakon početka pokusa i iznosila je 31,27  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ , dok je druga najveća aktivnost postignuta osam sati nakon početka pokusa i iznosila je 21,28  $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ . Indukcija provedena u drugim vremenima rezultirala je zanemarivom prividnom aktivnošću enzima monooksigenaze. Pri tome treba uzeti u obzir da su aktivnosti u ponovljenim pokusima provedenim na način da je indukcija napravljena osam sati nakon početka pokusa značajno međusobno odstupale što je rezultiralo velikom standardnom devijacijom.



### 4.3 Utjecaj trajanja indukcije na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Tablica 4. Utjecaj trajanja indukcije na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Vrijeme (h)	Prosječna specifična aktivnost, $\bar{U}_a$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ )	Standardna devijacija
0	2,923514	1,218523
2	5,439638	3,464203
4	3,767525	2,322075
6	1,796313	0,256899
8	6,604085	3,163351
10	6,904817	4,520483
12	7,638119	4,211097



Slika 10. Utjecaj trajanja indukcije

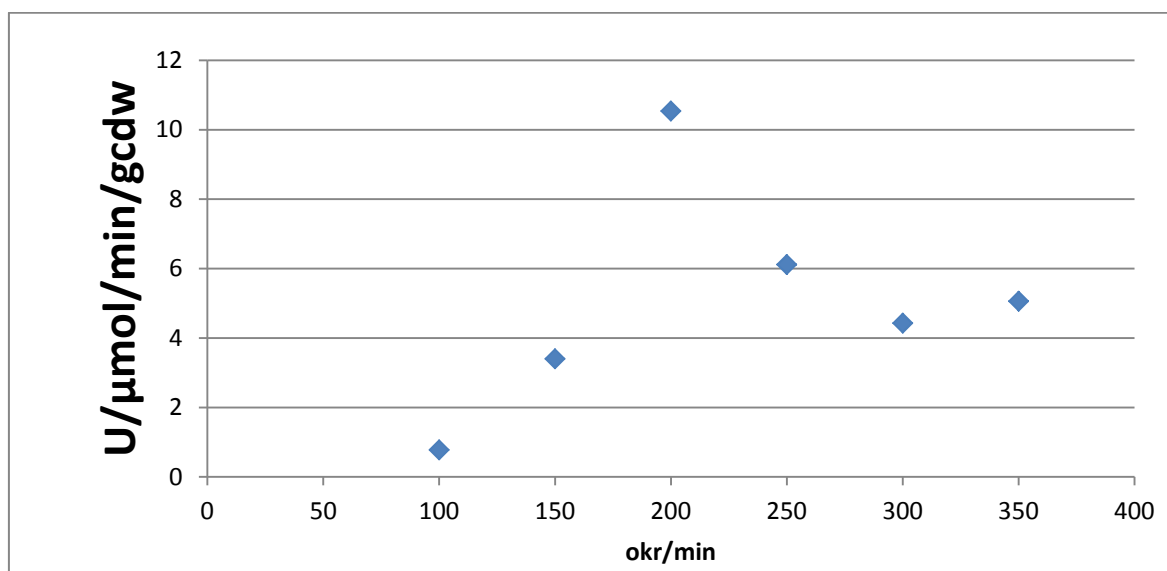
Na slici 10 i u tablici 4 prikazani su rezultati pokusa određivanja utjecaja trajanja indukcije na prividnu aktivnost. Eksperiment pokazuje da je najveća aktivnost postignuta pri

trajanju indukcije 12 sati te je iznosila  $7,63 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ . Nešto manje vrijednosti postižu se pri trajanju indukcije osam i deset sati te iznose  $6,60 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$  i  $6,90 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ .

#### 4.4 Utjecaj broja okretaja na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Tablica 5. Utjecaj broja okretaja na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Broj okretaja, 1/min	Prosječna specifična aktivnost, $\bar{U}_a$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ )	Standardna devijacija
100	0,775205	0,528451
150	3,397548	1,39654
200	10,53792	2,087323
250	6,115501	3,268348
300	4,424671	1,651224
350	5,055706	2,541466



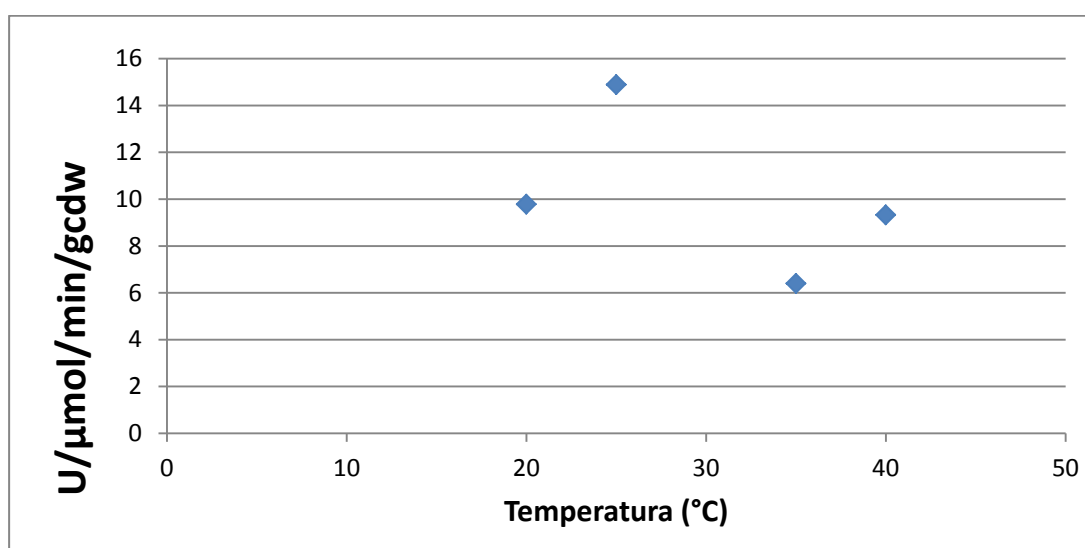
Slika 11. utjecaj broja okretaja na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Slika 11 i tablica 5 pokazuju rezultate pokusa određivanja utjecaja broja okretaja tijekom procesa indukcije na prividnu aktivnost enzima monooksigenaze. Najveća vrijednost ostvarena je pri 200 okretaja/min ( $10,53 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ ), što je dva puta veća vrijednost od one postignute u pokusu provedenom pri 250 okretaja/min.

#### 4.5 Utjecaj temperature na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Tablica 6. Utjecaj temperature na specifičnu aktivnost enzima monooksigenaze

Temperatura, °C	Prosječna specifična aktivnost, $\bar{U}_a$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{cdw}})$ )	Standardna devijacija
20	9,782428	4,052141
25	14,89073	7,132253
35	6,40435	0,140629
40	9,32914	5,580822



Slika 12. Utjecaj temperature

Slika 12 i tablica 6 prikazuje rezultate pokusa određivanja utjecaja temperature pri kojoj se provodila indukcija na postignutu prividnu aktivnost enzima monooksigenaze. Rezultati

pokazuju da je najveća prividna aktivnost postignuta pri temperaturi 25°C te je iznosila 14,89 $\mu$ mol/(min\*g<sub>cdw</sub>).

## 5. Zaključak

U ovom radu određeni su optimalni uvjeti za indukciju biomase u procesu oksidacije stirena u (*S*)-stiren oksid. Određene su optimalne vrijednosti vremena indukcije, trajanja indukcije, pH-vrijednosti indukcije, broja okretaja i temperature. Optimalni uvjeti provedbe procesa su kako slijedi: temperatura 25 °C, 200 okr/min, indukcija u vremenu 6 sati nakon početka uzgoja biomase, pH-vrijednosti 6,5 i trajanje indukcije 12 sati.

Ovo je djelomično u nesuglasju s literaturnim podacima koji navode da su optimalni uvjeti provedbe procesa temperatura 30 °C, 250 okr/min, indukcija osam sati nakon početka uzgoja biomase, pH-vrijednosti 7,0 i vrijeme trajanja indukcije osam sati.

## 6. Literatura

4. Nogales, J.; Palsson, B. Ø.; Thiele, I.: A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory, BMC Systems Biology, 2008, 2:79
5. Singleton, P: Introduction to Bacteria, J. Med. Microbiol., (1993) str. 38, 388
6. Kara Rogers: Bacteria, (<https://www.britannica.com/science/bacteria>) pristupljeno kolovoz 2016.
7. Singleton, P: Introduction to Bacteria, John Wiley & Sons, Chichester, 1992.
8. Gomes, NC; Kosheleva, IA; Abraham, WR; Smalla, K (2005). "Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community". FEMS Microbiology Ecology. 54 (1): 21–33.
9. Ward, PG; Goff, M; Donner, M; Kaminsky, W; O'Connor, KE (2006). "A two step chemobiotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic". Environmental Science & Technology. 40 (7): 2433–7.
3. den Dooren de Jong, L. E. *Bijdrage Tot de Kennis van het Mineralisatieproces*. Nijgh & van Ditmar, Rotterdam, The Netherlands, 1926).
10. Nagasawa, T. & Yamada, H. in *Biocatalysis* (ed. Abramowicz, D. A.) 277–318 (Van Nostrand Reinhold, New York, 1990).
11. Wackett, P.L., *Pseudomonas putida* - a versatile biocatalyst, Nature Biotechnology, 23 (2003) 136-138.
1. Bond, J. A. 1989. Review of the toxicology of styrene. Crit. Rev. Toxicol. 19:227–249.
2. Foureman, G. L., C. Harris, F. P. Guengerich, and J. R. Bend. 1989. Stereoselectivity of styrene oxidation in microsomes and in purified cytochrome P-450 enzymes from rat liver. J. Pharmacol. Exp. Ther. 248:492–497.
13. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Volume 82, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Press, Lyon, (2002) str. 437 – 441.
14. Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., Wubbolts, M.G. Towards a biocatalyst for (S)- styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas sp.* strain VLB120. Applied and Environmental Microbiology 64 (1998) 2032-2043.

15. Park, J., B., Buhler, B., Habicher, T., Hauer, B., Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation, *Biotechnology and Bioengineering*, **95** (2006) (3) 501-512.
16. Donghyun L., Yang Hee K., Jeong Chan J., Young Je Y., Electroenzymatic synthesis of (S)-styrene oxide employing zinc oxide/carbon black composite electrode, *Enzyme and Microbial Technology*, **47** (2010) 313–321.
12. Schmid, A., Hollmann, F., Byung Park, J., Bühler, B., The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 359-366.
17. Park,JB.; Bühler,B. Panke,S.; Witholt,B.;Schmid,A.; Carbon Metabolism and Product Inhibition Determine the Epoxidation Efficiency of Solvent- Tolerant *Pseudomonas* sp. Strain VLB120DC, , *Biotechnology and bioengineering* **98** (2007) 1219-1229.

## **7. Životopis**

Tomislav Rimac rođen je 24. kolovoza 1990. u Zagrebu. Pohađao je Osnovnu školu "Rugvica" u Rugvici. Nakon završene osnovne škole upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga u Zagrebu, koju završava 2009. godine. Iste godine upisuje se na prediplomski studij Ekoinženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, kojeg završava u rujnu 2016. godine.